

1/34/7 (Item 3 from file: 351)

003874561

WPI Acc No: 1984-020095/198404

**Measuring lipoprotein cholesterol level - by subjecting to electrophoresis then adding colouring agent contg. cholesterol esterase and dehydrogenase**

Patent Assignee: NIPPON CHEMIPHAR CO (NICM )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 58210000	A	19831207	JP 8292731	A	19820531	198404 B

Priority Applications (No Type Date): JP 8292731 A 19820531

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 58210000	A		3		

Abstract (Basic): JP 58210000 A

Sample is subjected to electrophoresis to fractionate lipoprotein cholesterol, and a colouring agent contg. cholesterol esterase (CE), cholesterol dehydrogenase (CDH) which is dependent upon NAD originated from anaerobes, NAD, diaphorase (DI) and NTB is contacted with the lipoprotein cholesterol.

The measurement of lipoprotein cholesterol level in serum is important for examination of diseases of coronary system, etc. Sharp and clear coloured pattern can be obtd. in short time, and thus accurate measurement is possible. The colouring agent contains 10-15 microns of CE, 6-15 microns of CDH, 10-15 microns of DI, 10 -15 mMgof NAD and 0.5-1 mM of NTB. The colouring can be conducted by incubation of 35-38 deg.C for 20-40 minutes. The electrophoresis is conducted at 90V for 60-70 minutes.

0/0

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Additional): C12Q-001/60; G01N-027/26

SOURCE: (C) WPI / DERWENT

AP 2044526

AN : 84-020095 [04]

MC : B01-D02 B04-B02C B04-B02C2 B04-B03 B04-B04D B07-D13 B11-C07B B12-K04  
D05-A02

PN : JP58210000 A 831207 DW8404 003pp

PR : JP820092731 820531

PA : (NICM ) NIPPON CHEMIPHAR CO

DC : B04 D16

IC : C12Q1/60 ;G01N27/26

TI : Measuring lipoprotein cholesterol level - by subjecting to electrophoresis then adding colouring agent contg. cholesterol esterase and dehydrogenase

AB : J58210000 Sample is subjected to electrophoresis to fractionate lipoprotein cholesterol, and a colouring agent contg. cholesterol esterase (CE), cholesterol dehydrogenase (CDH) which is dependent upon NAD originated from anaerobes, NAD, diaphorase (DI) and NTB is contacted with the lipoprotein cholesterol.

- The measurement of lipoprotein cholesterol level in serum is important for examination of diseases of coronary system, etc. Sharp and clear coloured pattern can be obtd. in short time, and thus accurate measurement is possible. The colouring agent contains 10-15 microns of CE, 6-15 microns of CDH, 10-15 microns of DI, 10 -15 mMg of NAD and 0.5-1 mM of NTB. The colouring can be conducted by incubation of 35-38 deg.C for 20-40 minutes. The electrophoresis is conducted at 90V for 60-70 minutes.(0/0)

⑨ 日本国特許庁 (JP)  
⑫ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開  
昭58—210000

⑩ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 Q 1/60  
G 01 N 27/26  
33/92

識別記号  
庁内整理番号  
8213—4B  
7363—2G  
8305—2G

⑬ 公開 昭和58年(1983)12月7日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 3 頁)

⑭ リポ蛋白質コレステロール濃度の測定方法

⑯ 特 願 昭57—92731  
⑰ 出 願 昭57(1982)5月31日  
⑱ 発 明 者 浦田武義  
東京都北区西ヶ原2丁目29番3

号日本ケミファ西ヶ原寮内  
⑲ 出 願 人 日本ケミファ株式会社  
東京都千代田区岩本町2丁目2  
番3号  
⑳ 代 理 人 弁理士 有賀三幸 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

リポ蛋白質コレステロール濃度の測定方法

2. 特許請求の範囲

検体を電気泳動に付してリポ蛋白質コレステロールを分離した後、該リポ蛋白質コレステロールにコレステロールエステラーゼ、好気性微生物由来のNAD依存性コレステロールデヒドロゲナーゼ、NAD、ジアフオラーゼ及びNTBを含有する染色試薬を作用させて発色せしめることを特徴とするリポ蛋白質コレステロール濃度の測定方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はリポ蛋白質コレステロール濃度の測定方法に関する。

一般に、血清中のリポ蛋白質コレステロール、血中高比重リポ蛋白質コレステロール(HDL-C)濃度の測定は、冠状動脈症等の疾患の成因や診断の場にて有用である。

而して、従来よりリポ蛋白質コレステロール濃度の測定法としては種々の方法が報告せられてい

るが、それぞれに難点があり、臨床上未だ充分満足し得るものはなかった。

そこで、本発明者は斯かる従来の難点を解消し、信頼性の高い、臨床上有効な測定方法を提供すべく種々研究を重ねた結果、染色反応が速く、シャープで鮮明なパターンが得られる新規な染色試薬を開発し、本発明を完成したものである。

すなわち、本発明は検体を電気泳動に付してリポ蛋白質コレステロールを分離した後、該リポ蛋白質コレステロールにコレステロールエステラーゼ(以下CEと略称す)、好気性微生物由来のNAD依存性コレステロールデヒドロゲナーゼ(以下ODHと略称す)、NAD、ジアフオラーゼ(以下DIと略称す)及びNTBを含有する染色試薬を作用させて発色せしめることを特徴とするリポ蛋白質コレステロール濃度の測定方法である。

本発明を実施するには、まず血清等の体液を検体として電気泳動に付してリポ蛋白質コレステロールを分離する。而してここに電気泳動はリポ蛋

白質コレステロールを分画し得るものであれば、その具体的泳動法の如何を問わないが、例えば泳動用支持体としては薄層アガロースフィルムが、支持体緩衝液としてはバルビタール緩衝液が、泳動用緩衝液としてはトリシン-Li緩衝液が好適であり、泳動条件としてはアガロースフィルム-コーニングシステムで90V、60~70分間泳動で目的を達することができる。

次に、該電気泳動により分離せられたリポ蛋白質コレステロール、すなわち高比重リポ蛋白質コレステロール(HDL-C)、超低比重リポ蛋白質コレステロール(VLDL-C)、低比重リポ蛋白質コレステロール(LDL-C)に、CE、ODH、NAD、DI及びNTBを含有する染色試薬を作用させる。

ここに染色試薬は、例えば0.1MトリシンNa(pH7.6~9.6)3ml中、CE10~15u、ODH6~15u、DI10~15u、NAD10~15mM、NTB0.5~1mMを配合することによつて調製される。

により、HDL-C、VLDL-C、LDL-Cの各分画量を測定する。そして、常法により求めた総コレステロールに各々を乗じてHDL-C、VLDL-C及びLDL-Cの濃度を測定する。

以上の如く本発明は構成されるので、本発明方法を用いれば、迅速な染色反応により、シャープかつ鮮明なパターンを得ることができ、極めて正確なリポ蛋白質コレステロール濃度の測定を行い得るものである。しかも本発明によるときは非特異反応も全く認められず、臨床上極めて有利な測定法である。

以下実施例を挙げて本発明を更に説明する。

#### 実施例

##### (1) 電気泳動条件

泳動用支持体：薄層アガロースフィルム

支持体緩衝液：60mMバルビタール緩衝液

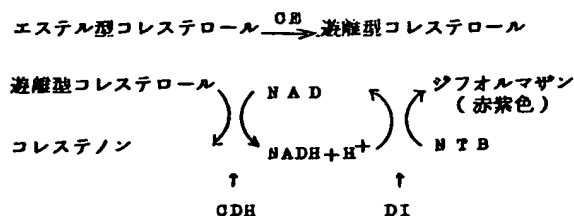
泳動用緩衝液：50mMトリシン-Li緩衝液(pH8.6)

泳動条件：アガロースフィルム-コーニングシステム、90V、70分間泳動

尚、本発明に用いられるODHは、前述の如く好気性微生物由来のNAD依存性のものであることが必須であるが、斯かるODHとしては天野製薬株式会社より提供されているものが好適である。

而して、斯かる染色試薬をリポ蛋白質コレステロールに作用させる方法としては所謂浸漬法、サンドイッチ法の何れをも採用し得るものであつて、通常35~38℃で20~40分間程度インキュベーションすることによつてリポ蛋白質コレステロールを発色せしめることができるものである。

この発色原理は次式の通りである。



次いで、斯かる発色反応を発色反応停止液(10%酢酸)を用いて停止せしめた後、精製水にて洗浄後乾燥し、濃度計(densitometer)等

##### (2) 試薬の調製

###### ① 染色試薬組成

0.1MトリシンNa(pH8.6)	3ml
CE	10u
ODH	6u
DI	10u
NAD	10mM
NTB	0.73mM

###### ② 染色反応停止液：10%酢酸

###### ③ 洗浄液：精製水

##### (3) 測定例

試料として血清3μLを上記電気泳動条件により電気泳動後、アガロースフィルムをセルから除去し、上記組成染色試薬3mlをゲル表面に均一に広げ、37℃で30分間反応させたところ、シャープな赤紫色のコレステロール分画が得られた。

反応後10%酢酸に約1時間、次いで精製水に約1時間浸した後1.0g/Lグリセロールを含む3%酢酸中に約2分間浸した。

然る後、70℃で20分間ドライヤーにて乾燥

後、分画リポタンパク中のコレステロール分画を  
 を570 nmにてデンストメトリー (densitometry)  
 して、HDL-C、VLDL-C、LDL-C  
 各々35%、5%、60%を得た。そして、常法  
 によつて得た総コレステロール値195 mg/dL  
 を乗じ、HDL-C: 68 mg/dL、VLDL-C:  
 10 mg/dL、LDL-C: 117 mg/dLを得た。

(4) 非特異反応

染色試薬からODHだけ抜いた血清プラーク用  
 試液を作り、アガロースフィルムにて泳動した血  
 清分画面上及びアガロースフィルム全面に対する非  
 特異反応を検討したところ何れも非特異反応を認め  
 なかった。

以 上

出願人 日本ケミファ株式会社

代理人 弁護士 有 賀 三 幸

弁護士 高 野 登志雄

弁護士 小 野 信 夫

